

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK

Funkció szerint:

- Hormonok (inzulin, eritropoietin)
- Hemosztázis fehérjék (VIII faktor, tPA)
- **ANTITESTEK** (parenterális - labor)
- Vakcinák (nem csak a rekombináns)

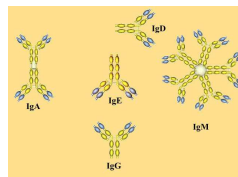


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

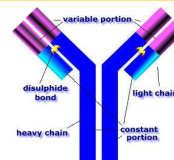
Antitestek

Az ellenanyag molekulák nagy része az úgynevezett immunoglobulin (Ig) fehérjecsalád tagja. Feladatuk, hogy specifikusan az adott antigénhez kapcsolódva olyan folyamatokat indítsanak el ami az antigén hatástalanításához vezet:



- vírusinaktiválás
- baktériumok agglutinálása
- megjelölés fagocitózisra

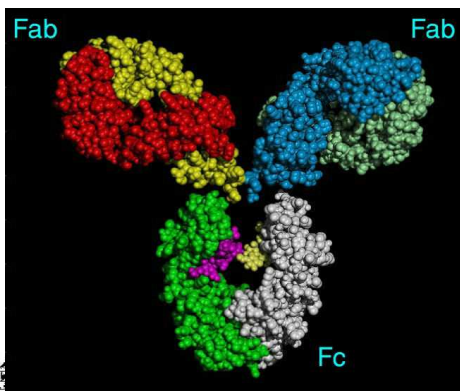
Az antigén felületén a kapcsolódási rész: epitóp



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

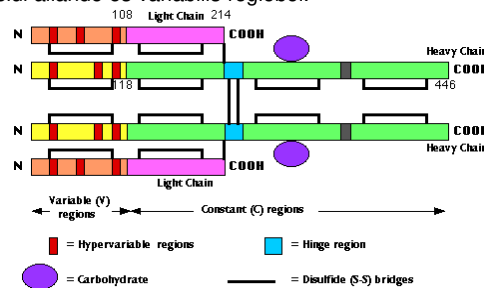
2

Antitestek



Az antitestek fehérjeszerkezete

Két-két egyforma könnyű és nehéz láncból állnak, ezen belül állandó és variábilis régióból.

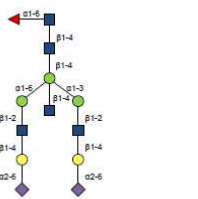
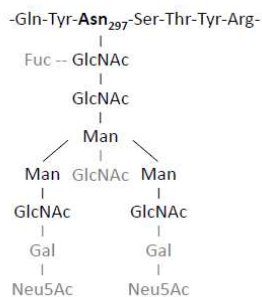


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

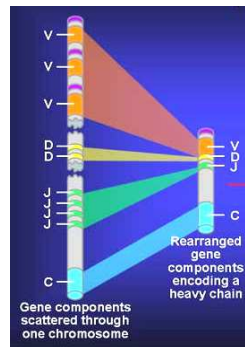
Az antitestek glikozilálása

A nehéz láncokon egy-egy N-glikozilálási hely van (Asn-297). A galaktózok és a neuraminsavak száma szerint több izoforma létezik.



5

Antitestek



A szervezet ~10⁷-10⁹ féle különböző antitest előállítására képes. Ennek alapja, hogy antitest doménjei sok változatban tárolódnak a génállományban, és a kiírás során ezek random módon kombinálódhatnak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Antitestek

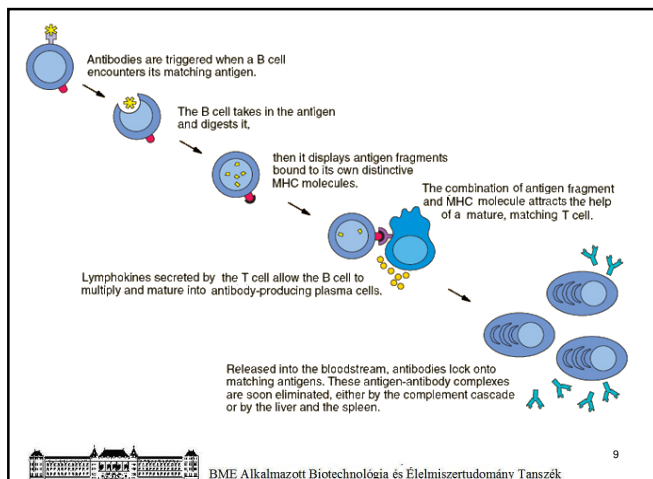
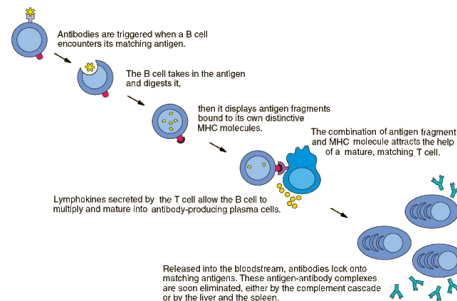
A könnyű lánc kétféle izoformában létezik, ezek mindkét doménje is több változatban létezik, ami további kombinációkat tesz lehetővé:

	Domének	Génváltozatok	Lehetséges kombinációk	Lehetséges kombinációk	Lehetséges kombinációk
Könnyű lánc	V _κ	40	200 féle κ lánc	324 féle könnyű lánc	2.5 x 10 ⁶ féle antitest
	J _κ	5			
	V _λ	31	124 féle λ lánc		
	J _λ	4			
Nehéz lánc	V _H	51	7650 féle nehéz lánc		
	D _H	25			
	J _H	6			

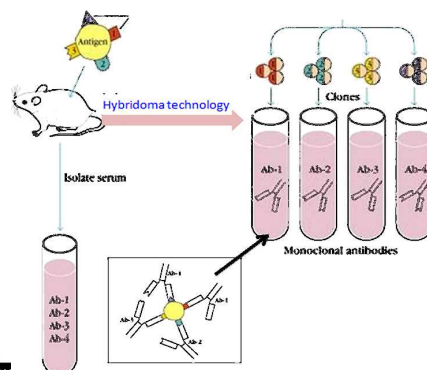


Antitestek

A szervezetben egy adott antitest tömeges termelését a plazmasejtje alakult B sejtek végzik.



Poliklonális és monoklonális antitestek



Monoklonális ellenanyagok

- egyetlen B-limfocita klón termékei
- homogének (antigénspecifitás, affinitás, izotípus)
- kiszámítható hatás, kevés mellékhatás
- előnye a poliklonális ellenanyaggal szemben, hogy a meghatározott specifitású és izotípusú ellenanyagok **nagy mennyiségben** és **azonos minőségben** („pharmacology-grade”) állíthatók elő
- jelentős a szerepük a gyógyászat, az immunanalitika, az affinkromatográfia területein



Miért hibridóma?

Az antitesteket termelő plazmasejtnek nem képesek osztódni, nem lehet sejtenyészetben szaporítani és termeltetni.

Csak a tumorsejtnek képesek korlátlanul osztódni (immortality).

E két tulajdonság egyesítésével kaphatunk olyan sejtvonalat, amely:

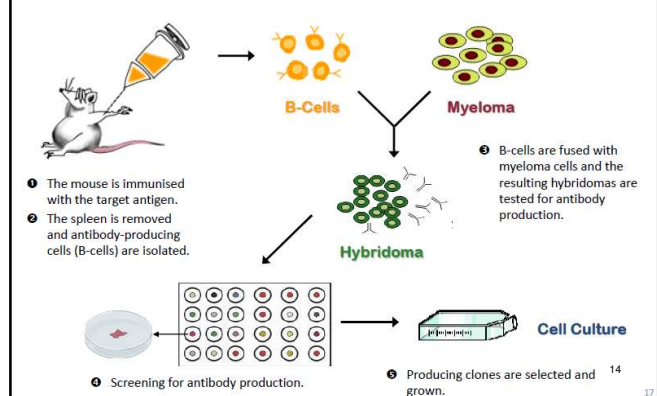
- monoklonális antitestet termel
- korlátlanul szaporítható



Monoklonális ellenanyag előállítás menete

- egér/patkány beoltása antigénnel (több lépcsőben)
- lép vagy nyirokcsomó eltávolítása, homogenizálása
- lépből származó plazmasejtek + egér tumorsejtek (plazmacitóma/mielóma sejtek) fúziója
- Az ellenanyag termelő klónok azonosítása, izolálása
- A termelő hibridómák folyamatosan szaporodnak és ellenanyagot termelnek, ami a tápoldatban feldúsul

Hibridóma technológia



Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

A fúzió után többféle sejt van jelen:

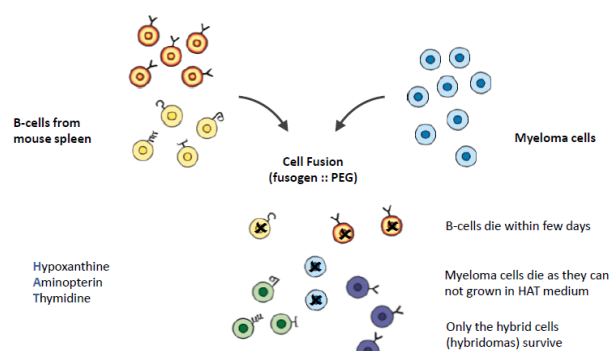
- fuzionálatlan plazmasejtek
- fuzionálatlan tumorsejtek
- hibridómák

ezek közül kell izolálni a hibridómákat.

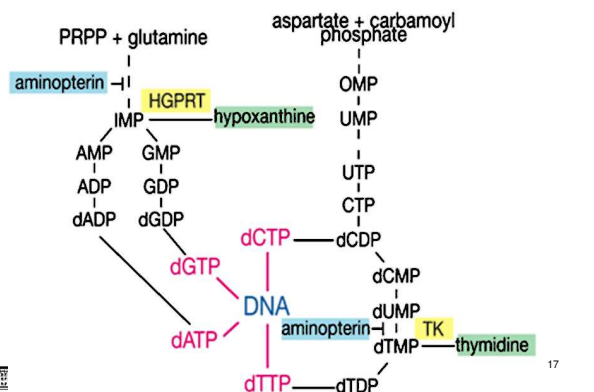
A szelekció azon alapul, hogy a tumorsejtekbe még a fúzió előtt két anyagcsere markert építenek be (két enzim hiánya) →

HAT médiumon (hipoxantin, aminopterin, timidin) csak a fuzionált sejtek képesek szaporodni. →

Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

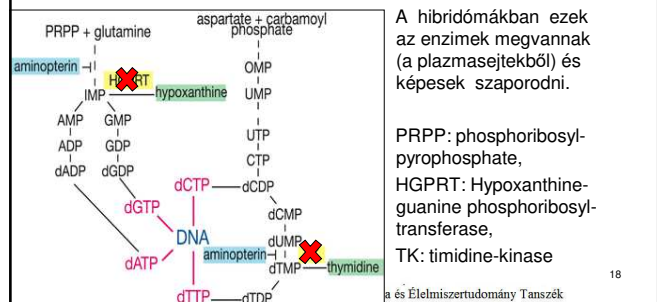


Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"



Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

HGPRT és TK hiányos mutánsok hiába kapnak segítséget (hipoxantin, timidin), nincs nukleotid szintézis – a mielóma sejtek elpusztulnak.



A monoklonális antitestek felhasználása

Az antitestek több célra is felhasználhatók:

1. *In vitro* felhasználás:

- Biokémiai kutatások
- Immun-analitikai eljárások
- Feldolgozási műveletekben (pl. affinkromatográfia)

2. Humán (parenterális) felhasználású antitestek:

- Diagnosztikában (pl. Proscint)
- Terápiában (elsősorban tumorok ellen)



Mi a különbség?

Az egérben termelt antitestek az egérre jellemző aminosav-szekvenciákat és glikozilálást tartalmaznak, tehát emberbe adva fajidegen fehérjeként immunválaszt indukálnak

→ allergia (HAMA: Human Anti-Mouse Antibodies)

Hogyan kerülhető meg a probléma?

→ a terápiás antitestek humanizálása



Murine típusú antitestek

A kezdeti antitestek murine (= rágcsáló) fehérjék voltak - in vitro működött, a terápiában nem.

A kudarc okai: rövid felezési idő (in vivo), limitált bejutás a tumorba, elégtelen funkció = kicsi a citotoxikus stimuláló hatás

Anyaga az ismételt beadás után gyakran erős allergiás rohagot, rosszabb esetben anafilaxiás sokkot okozott.

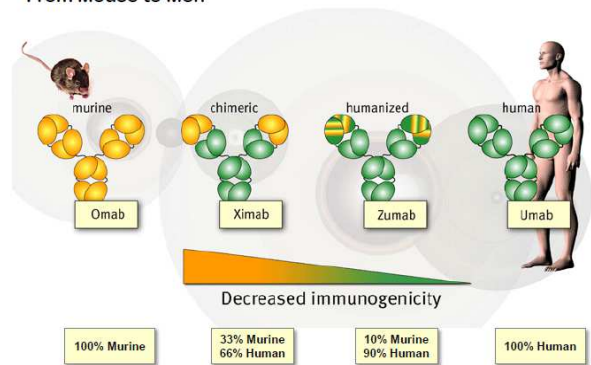
Ezért rekombináns DNS manipulációs technikákkal fokozatosan lecserélték az állati géneket emberire.

HIBRIDÓMA → génmanipuláció → **SEJTENYÉSZET**

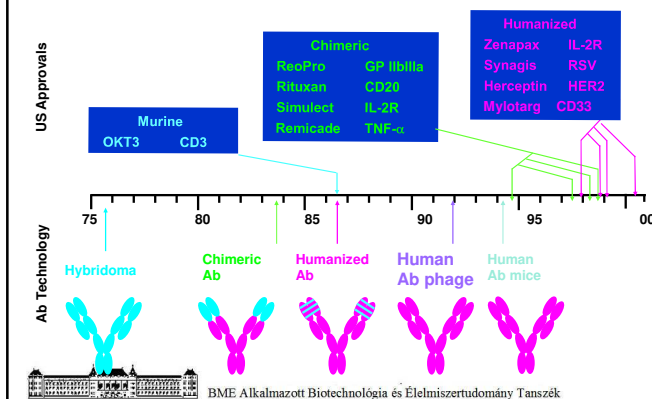


A monoklonális antitestek fejlődése

From Mouse to Men



Történeti áttekintés

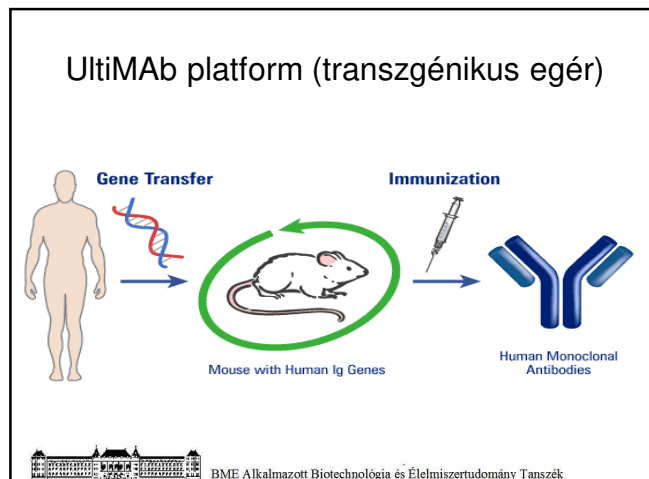
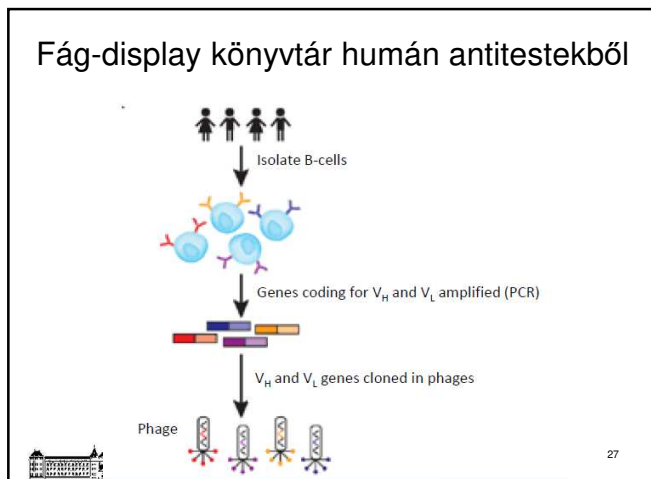
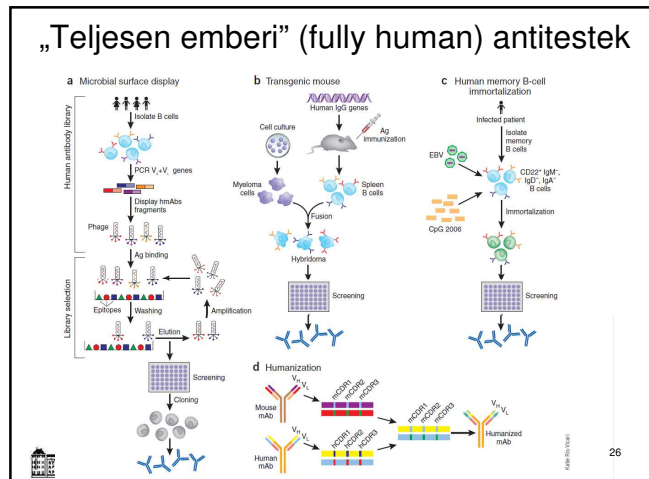
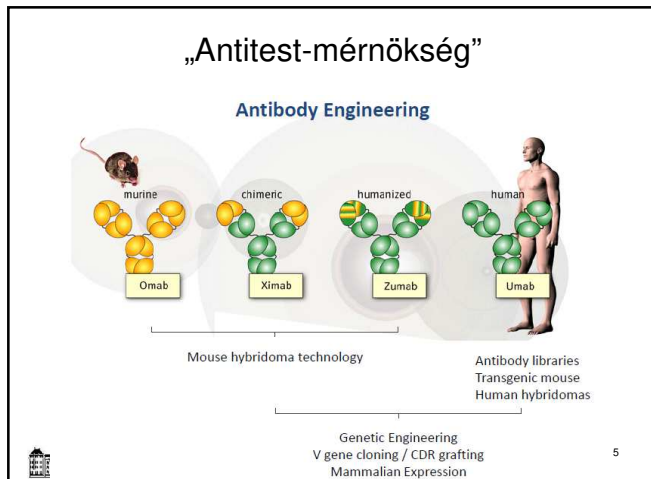


Kiméra és humanizált monoklonális antitestek

- A kiméra antitestek: murine antitest variábilis régióját egyesítették a humán konstans régióval. Az eredmény 65% humán antitest (κ könnyűlánc + nehézlánc)

- Humanizált antitesthez akkor jutunk a murine antitestből "átvisszük" a hipervariábilis domént a humán antitestbe. 95%-a humán eredetű, de valamilyen a kötődés az antigénnel gyengébb, valamint az affinitása is kisebb, mint a kiindulási murine antitestnek





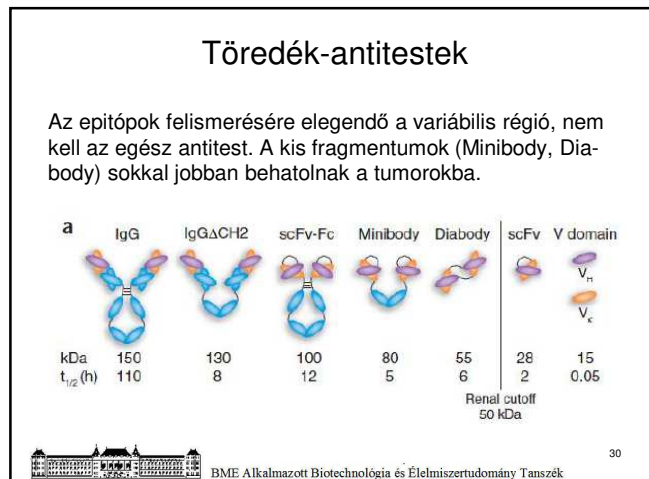
In vitro antitest-kutatás

Számítógépes antitest-könyvtárak - fontos az antitest-molekulák részletes szerkezeti és funkcionális ismerete. Típusaik:

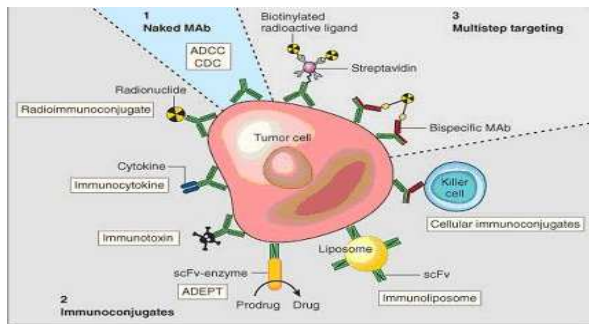
- természetes: az ellenanyag-gének adat formájába történő konvertálásával alakítják ki, s az így kapott repertoárt használják fel az aktuális vizsgálatokhoz.
- szintetikus könyvtárak: precízen megtervezett, mesterségesen megalkotott DNS-molekulákat (a mesterséges antitestek génei) építenek fel. A természetes immunrepertoárt meghaladó diverzitás is létrehozható, illetve az ellenanyag-molekulák specifikálásában is hihetetlen pontosság érhető el.
- szemi-szintetikus könyvtárak: amelyekben egyes mesterségesen kialakított antigénkötő oldalakat természetességekkel kombinálnak.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29



Monoklonális ellenanyagok a tumor-terápiában



Radio-immunterápia

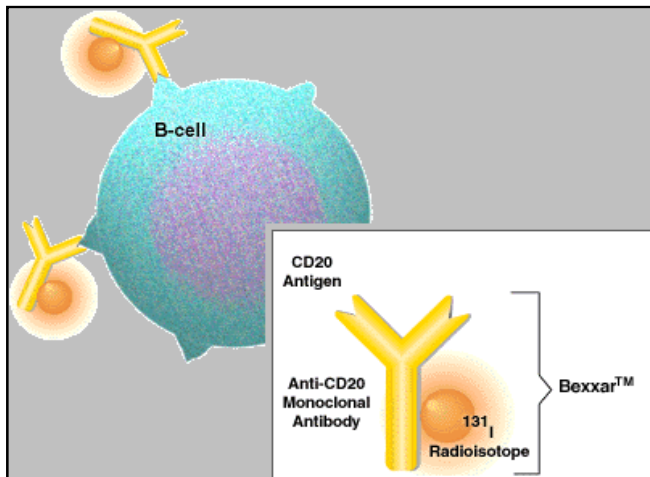
A monoklonális antitest terápia hatásosságának fokozás volt a cél a monoklonális antitesthez konjugált radioizóp kezelés kifejlesztésének

Módszer alapja: a lymphoid daganatok sugárzásérzékenyek, így a monoklonális antitesthez kötött radioizotóp CÉLZOTT sugárterápiát tesz lehetővé.

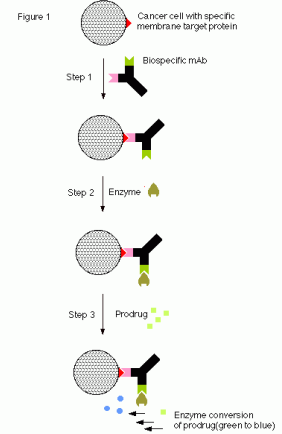
Emellett a MAB és az izotóp B-sejt károsító hatása összeadódik. Ma 2 radioizotóppal konjugált anti CD-20 készítmény áll rendelkezésre.

A tositumomab (Bexxar) monoklonális anti-CD-20 antitest és ¹³¹I konjugátum (75-80 % remisszió)

A másik készítmény az ibritumomab (Zevalin), ami monoklonális anti CD-20 antitest és ⁹⁰Y konjugátum (67% remisszió)



Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)



Az antitesthez enzimet kötnek, mely a később szisztémásan bevitt, ártalmatlan prodrug vegyületet lokálisan alakítja a citotoxikus, hatékony metabolitá

Immuno-liposzómák

Az immuno-liposzómák antitest és liposzóma összekapcsolását jelenti.

A liposzómák képesek gyógyszerek vagy terápiás nukleotidszármazékok szállítására.

Így a szerek célzottan hatnak a tumorsejtekre.

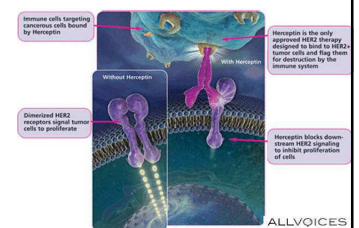
Ez a technológia még gyerekcipőben jár, de már sikeresen alkalmazták in vivo körülmények között tumorsejt növekedésgátlásra.

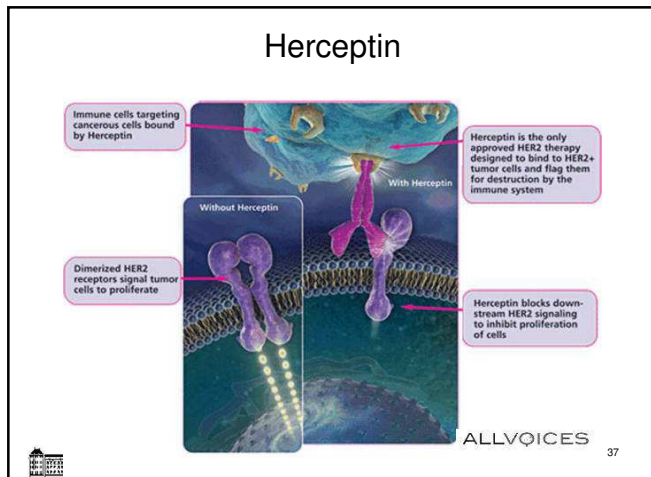
Agytumor és a mellrák kezelésére már használják.

Herceptin

Az antitest hatása kettős:

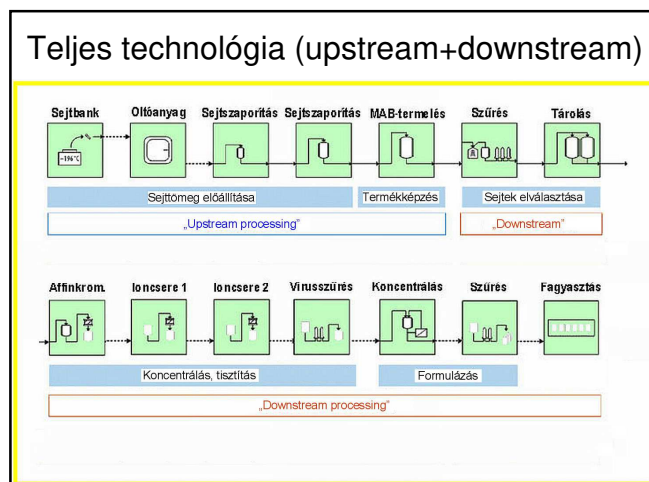
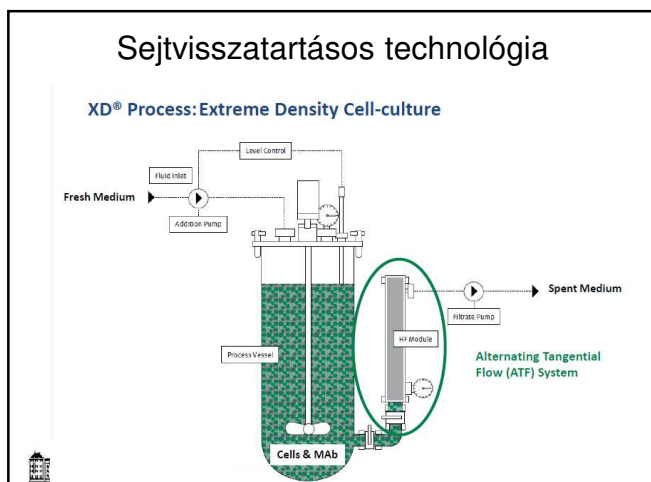
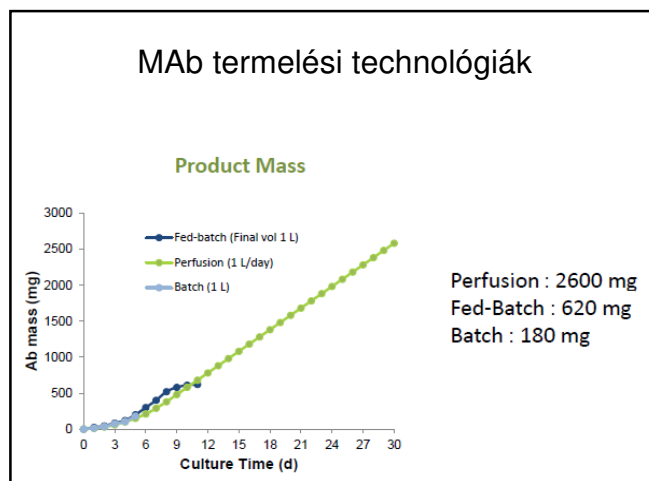
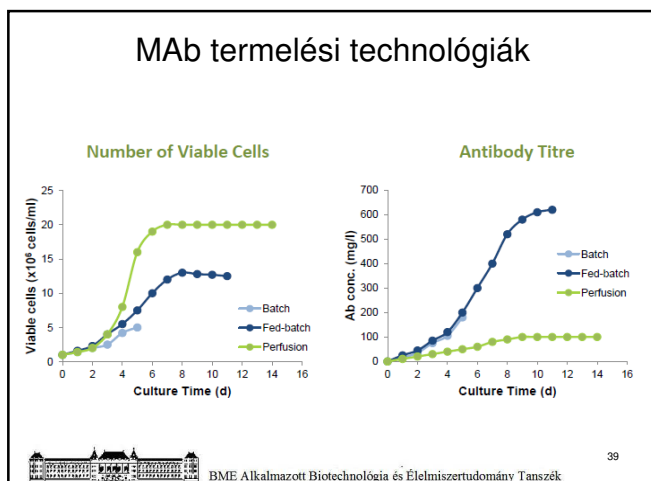
- egyrészt akadályozza a tumorsejt osztódását (kötődésével megakadályozza a HER2 receptorok dimerizálódását).
- másrészt megjelöli a tumorsejtet az immunrendszer számára.





MAb termelési technológiák

Product	Culture system	Bioreactor Train Scale
ReoPro	Continuous/Perfusion (spin-filter)	10 – 500 L
Zenapax	Fed-batch (stirred tank)	Not disclosed
Simulect	Continuous/Perfusion (membrane)	Not disclosed
Synagis	Fed-batch (stirred tank)	400 – 10000 L
Remicade	Continuous/Perfusion (spin-filter)	10 – 500 L
Herceptin	Fed-batch (stirred tank)	80 – 12000 L
MyoScint	Continuous/Perfusion (spin-filter)	10 – 500 L
Humaspect	Continuous/Perfusion (hollow-fibre)	Not disclosed



Esettanulmány: Simulect

Immunszuppresszáns, szervátültetésekénél a limfocitákat 30-40 napra kiüti.

Humanizált, a génszerelvényt SP2/0 sejtvonalba építették be.

Szuszpenziós tenyészet, folytonos, sejtviasszartással → nagy sejtsűrűség

Genes encoding the Ig Light-Chain: L, VL, J, Enhancer, CL

Genes encoding the Ig Heavy Chain: VH, VH, Enhancer, CH1, Hinge, CH2, CH3

IgG

Legend: Mouse (blue), Human (white)

43

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Esettanulmány: Simulect

• stirred tank, suspension, continuous cell cultivation with cell retention:

Flow: dilution rate 0.6 - 1.0 / day

Medium Tank 4000 L

250 L Production Bioreactor

Cell Retention

Harvest Tank

one part harvest = ca. 1000 L

44

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Esettanulmány: Simulect

A fermentáció lefutása

A forgó szita szűrő

45

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Monoklonális antitestek nevezéktana

Prefix	Target	Source	Suffix	
variable	-o(s)-	bone	-u-	human
	-vi(r)-	viral	-o-	mouse
	-ba(e)-	bacterial	-a-	rat
	-li(m)-	immune	-e-	hamster
	-le(s)-	infectious lesions	-i-	primate
	-ci(r)-	cardiovascular	-xi-	chimeric
	-mu(l)-	musculoskeletal	-zu-	humanized
	-ki(n)-	interleukin	-axo-	rat/murine hybrid
	-co(l)-	colonic tumor		
	-me(l)-	melanoma		
	-ma(r)-	mammary tumor		
	-go(t)-	testicular tumor		
	-go(v)-	ovarian tumor		
	-pr(o)-	prostate tumor		
	-tu(m)-	miscellaneous tumor		
-neu(r)-	nervous system			
-tox(a)-	toxin as target			
			-mab	

46

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Monoklonális antitestek nevezéktana

Az előtag nem hordoz semmiféle információ, csak egyedinek kell lennie, általában utalás a gyógyszer nevére

A második tag utalás a gyógyszer célpontjára (pl -ci(r)- keringési rendszerre ható)

A következő tag a forrásról, illetve az antitest típusáról nyújt információt

Végül pedig a -mab utótag következik = monoclonal antibody)

Ellenőrző kérdés:
Melyik gyógyszerről lehet szó, és mit lehet tudni róla?

tras- + -tu(m)- + -zu- + -mab.???

47

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A „top 20” gyógyszerből 10 biotech termék

Source: EvaluatePharma, McKinsey

Drug	Type	Revenue
Humira	Biologic	10.1
Avastin	Biologic	8.9
Enbrel	Biologic	7.3
Rituxan	Biologic	6.8
Crestor	Conventional	6.3
Herceptin	Biologic	6.2
Remicade	Biologic	5.7
Lantus	Biologic	5.3
Seretide/Advair	Conventional	5.2
Prolia	Biologic	5.2
Revlimid	Conventional	4.8
Spriva	Conventional	4.6
Pfizerar	Biologic Vaccine	4.4
Lyrica	Conventional	4.1
VX-950	Conventional	3.7
Xarelto	Conventional	3.6
Januvia	Conventional	3.6
Atripla	Conventional	3.5
Lucentis	Biologic	3.4
Truvada	Conventional	3.4

48

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

